

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000932

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2004-0022413  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office

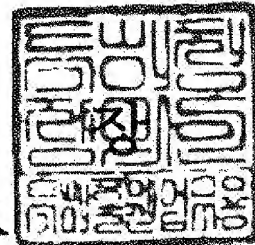
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0022413 호  
Application Number 10-2004-0022413

출 원 일 자 : 2004년 03월 31일  
Date of Application MAR 31, 2004

출 원 인 : 퓨리메드 주식회사  
Applicant(s) PURIMED CO., LTD.

2005 년 06 월 09 일

특 허 청  
COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.03.31
【발명의 국문명칭】	우울증 치료용 연자육 추출물, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 건강식품
【발명의 영문명칭】	Extract of Nelumbinis Semen for the treatment of depression, medicinal composite and health foods including the extract of Nelumbinis Semen
【출원인】	
【명칭】	퓨리메드 주식회사
【출원인코드】	1-2000-047032-1
【대리인】	
【명칭】	특허법인 맥
【대리인코드】	9-2003-100064-5
【지정된변리사】	홍재일, 홍종원, 이은옥, 홍지명, 김윤선
【포괄위임등록번호】	2003-060727-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배현수
【성명의 영문표기】	BAE, Hyun Su
【주민등록번호】	641024-1010613
【우편번호】	137-040
【주소】	서울특별시 서초구 반포동 미도2차아파트 503동 202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강문규

【성명의 영문표기】	KANG,Moon Kyu
【주민등록번호】	670915-1182444
【우편번호】	472-709
【주소】	경기도 남양주시 도농동 2-1 부영아파트 301동 2202호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	오정완
【성명의 영문표기】	OH, Jung-Wan
【주민등록번호】	710828-1006024
【우편번호】	461-180
【주소】	경기도 성남시 수정구 수진동 삼부아파트 108-1202
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조종운
【성명의 영문표기】	CHO,Chong Woon
【주민등록번호】	731111-1455520
【우편번호】	321-911
【주소】	충청남도 계룡시 두마면 입암리 205
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김창숙
【성명의 영문표기】	KIM,Chang Sook
【주민등록번호】	760625-2626611
【우편번호】	425-864
【주소】	경기도 안산시 단원구 초지동 590 이화맨션 나동 101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이화진

【성명의 영문표기】	LEE,Hwa Jin
【주민등록번호】	761129-2091017
【우편번호】	130-833
【주소】	서울특별시 동대문구 이문2동 385-7
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	심인섭
【성명의 영문표기】	SHIN, In Sop
【주민등록번호】	621207-1891918
【우편번호】	463-920
【주소】	경기도 성남시 분당구 수내동 양지마을 금호아파트 301동 1702호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	장춘곤
【성명의 영문표기】	JANG,Choon Gon
【주민등록번호】	651223-1347944
【우편번호】	440-300
【주소】	경기도 수원시 장안구 정자동 백설주공아파트 563-1006호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최현
【성명의 영문표기】	CH10,Hyun
【주민등록번호】	721104-1074221
【우편번호】	120-819
【주소】	서울특별시 서대문구 북아현1동 123-33
【국적】	KR
【발명자】	

【성명의 국문표기】 고은정  
【성명의 영문표기】 K0,Eun Jung  
【주민등록번호】 750703-2459819  
【우편번호】 130-827  
【주소】 서울특별시 동대문구 이문3동 255-142  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 안창준  
【성명의 영문표기】 AN,Chang Jun  
【주민등록번호】 760510-1094313  
【우편번호】 137-834  
【주소】 서울특별시 서초구 방배4동 833-35  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김현택  
【성명의 영문표기】 KIM,Hyun Taek  
【주민등록번호】 540824-1108822  
【우편번호】 110-011  
【주소】 서울특별시 종로구 구기동 현대구기빌라 3동 106호  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍무창  
【성명의 영문표기】 HONG,Moo Chang  
【주민등록번호】 500330-1010525  
【우편번호】 135-110  
【주소】 서울특별시 강남구 압구정동 408 미성아파트 22-1601  
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	신민규
【성명의 영문표기】	SHIN,Min Kyu
【주민등록번호】	481024-1024036
【우편번호】	130-090
【주소】	서울특별시 동대문구 휘경동 312-99
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 특허법인 맥 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	61 면 38,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	6 항 301,000 원
【합계】	339,000 원
【감면사유】	소기업(70%감면)
【감면후 수수료】	101,700 원
【첨부서류】	1.소기업임을 증명하는 서류[추후제출]_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 우울증 치료용 연자육 추출물, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 건강식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 연자육을 물로서 열수 추출하여 제조한 연자육 추출물을 제공하되, 본 발명의 연자육 추출물은 동물행동학적, 생화학적 방법을 통하여 강력한 항우울 활성을 나타내고 기존 항우울제의 부작용을 감소시키는 안전성이 확보되어 있으므로 우울증 치료용 조성물 및 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

연자육 추출물, 항우울 활성, 열수 추출



## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

우울증 치료용 연자육 추출물, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 건강식품  
{Extract of Nelumbinis Semen for the treatment of depression, medicinal composite and health foods including the extract of Nelumbinis Semen}

### 【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 본 발명의 연자육 추출물을 하루 투여한 흰쥐에 대한 강제수영검사에 있어서, 사지를 전혀 움직이지 않는 시간을 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,
- <2> 도 2는 본 발명의 연자육 추출물을 6일간 투여한 흰쥐에 대한 강제수영검사에 있어서, 사지를 전혀 움직이지 않는 시간을 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,
- <3> 도 3은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 CMS하의 자당용액 섭취양에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,
- <4> 도 4는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 CMS하의 체중에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,
- <5> 도 5는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 개방장하에서 방문한

방의 갯수에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<6> 도 6는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 개방장하에서 출발 잠재기에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<7> 도 7은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 개방장하에서 앞발 들고 일어서기에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<8> 도 8은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 개방장하에서 몸치장 행동에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<9> 도 9는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 사정의 수에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<10> 도 10은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 후사정 간격에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<11> 도 11은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 신경진달 물질의 증가유무에 있어서, 정상군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 투여

군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<12> 도 12는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 CMS하에서 신경전달 물질의 증가유무에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<13> 도 13은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 수용체 바인딩 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 오토라디오그래피이고,

<14> 도 14는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 해마의 CA2 부분의 수용체 증가에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<15> 도 15는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 해마의 CA3 부분의 수용체 증가에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<16> 도 16은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 뇌의 전면 대뇌피질 I-II 부분의 수용체 증가에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<17> 도 17은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 뇌의 시상하부 부분에서 수용체 증가에 있어서, 정상군, 대조군, 플로옥세틴 투여군 및 하이페리쿰 피포라툼 추출물 투여군 흰쥐와 비교한 그래프이고,

<18> 도 18은 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 관련 단백질 증감에 있어서, 정상군, 대조군 및 플로옥세틴 투여군 흰쥐와 비교한 사진이고,

<19> 도 19는 본 발명의 연자육 추출물을 투여한 흰쥐에 대한 관련 단백질 스팟의 세기에 있어서, 정상군, 대조군 및 플로옥세틴 투여군 흰쥐와 비교한 표이다.

### **【발명의 상세한 설명】**

### **【발명의 목적】**

### **【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<20> 본 발명은 우울증 치료 효과를 갖는 연자육(*Nelumbinis Semen, Nelumbo nucifera*) 추출물, 이를 포함하는 약학적 조성물 및 건강식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 연자육을 물로서 열수 추출하여 제조한 연자육 추출물 및 이 연자육 추출물을 유효성분으로 포함하는 우울증을 치료하기 위한 약학적 조성물과 건강식품에 관한 것이다.

<21> 현대의 복잡한 사회 속에서 발생하는 정신적 손상은 과거와는 달리 커다란 심리적 충격이나 자극에 의해서 나타나기보다는, 일상생활 속에서 일어나는 미약하지만 지속적이고 반복적인 스트레스에 의한 것이 많다. 이러한 스트레스는 환자 스스로도 인식을 못하면서 병원에서조차 이를 간과하기 쉬운 것으로, 약한 자극이 누적되어 개인을 우울증에 시달리게 한다.

<22> 우울증은 객관적 상황과는 관계없이 일어나는 정서적 병리현상으로 환자의 모든 생활이 우울한 기분으로 덮여있고, 흥미가 감소하고 무쾌감증(anhedonia)이

되며 정신운동의 저하, 염세감, 절망에 사로잡히게 되고 자살의욕을 느껴 자살기도에까지 이르는 질병인데, 식욕저하, 불면, 변비, 성욕감퇴, 면역기능 저하로 인한 질병에 대한 감수성이 높아짐 등 다양한 신체적 증상을 보인다.

<23>           우울증의 발생기전과 우울증의 치료제인 항우울제의 작용기전을 완벽하게 설명하는 이론은 아직 없다. 그러나 일반적으로는 중추신경계의 시냅스(synapse)내에 모노아민(monoamine)계 신경전달물질(neurotransmitter)인 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrin), 도파민(dopamine) 등이 부족하게 되면 우울증이 유발된다는 것이 가장 유력한 가설이다. 그래서, 항우울제는 모두 중추 세로토닌 또는 노르아드레날린 시냅스에서 신경전달물질의 농도를 높이는 약리작용을 가지고 있다.

<24>           항우울제는 신경전달물질의 농도를 높여주는 메카니즘에 따라 크게 삼환계 항우울제(TCA; tricyclic antidepressants), 모노아민 옥시다제 억제제(MAOI; monoamine oxidase inhibitors), 또는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI; selective serotonin reuptake inhibitors) 등이 많이 사용되고 있다.

<25>           개발된지 비교적 오래된 페넬진(phenelzine) 등과 같은 모노아민 옥시다제 억제제는 심장병 유발이라는 심각한 부작용이 있기 때문에 최근에는 잘 쓰이고 있지 않으며, 이미프라민 등과 같은 삼환계 항우울제 역시 항콜린성 부작용 및 진정 작용, 심혈관계에 대한 부작용이 상당한 문제점으로 남아 있다. 따라서, 최근에는 이와 같은 부작용이 적은 우울증 치료제로서 선택적 세로토닌(5-HT) 재흡수 저해제(selective serotonin reuptake inhibitor: 이하, 'SSRI'라 약칭함)를 이용한 우울

중 치료제의 개발에 초점이 되고 있으며, 그 대표적인 약제로서 플루옥세틴(fluoxetine, 제품명; 푸로작), 파로세틴(paroxetine, 제품명; 세로자트), 세르트랄린(sertraline, 제품명; 졸로푸트) 등이 개발되어 임상적으로 그 효능을 널리 인정받고 있다.

<26>

그러나, 상기한 약제 또한 전신피로감, 성기능장애, 불면증과 같은 부작용을 나타낸다. 일반적인 항우울제제의 투여는 세로토닌(serotonin)양을 증가시켜 세로토닌 수용체를 활성화시키고 그것의 다운 스트림(down-stream)인 PKA의 활성을 강화시키고 나아가 CREB, 뇌-유래 신경영양성 인자(brain-derived neurotrophic factor; BDNF)와 그것의 수용체인 trkB의 단백질양을 증가시키는 것으로 보고 되었으며 이것들은 항우울제제의 분자적인 수준에서 효과적인 작용표식으로 볼 수 있으며 이러한 BDNF의 증가 혹은 세로토닌 수용체의 활성화로 특히 해마(hippocampus)에서 손상된 뇌세포가 다시 회복되는 신경세포 재생성이라는 현상이 일어나 우울증 환자의 손상된 기억력을 회복시켜 주는 것으로 알려져 있다(J. of Psychosomatic Research 53, 687-697 (2002)). 또한, 항우울제의 투여는 보통 우울증에 걸려 있는 사람에게서 나타나는 면역저하의 대표적인 반응인 코르티솔(cortisol) 농도 감소, IL-2 농도감소, WBC 숫자감소, 림프구(lymphocyte) 숫자감소를 정상수치로 올려주어 다시 정상적인 면역체계를 이룰 수 있도록 하는 것으로 알려져 있다(Ann N Y Acad Sci. 917, 478-487 (2000)). 이러한 작용효과 또한 항우울제의 우울증 치료효과의 또 다른 징표로 볼 수 있다.

<27>

최근에는 서양에서도 천연약재 추출물의 약효를 인정하고 연구하는 추세에

있으며, 우울증과 관련해서는 주로 세인트 존의 식물(St. John's wort)이라 불리는 하이페리쿰 퍼포라툼(Hypericum perforatum)의 추출물을 이용한 연구가 진행되고 있다(Neuropharmacology, 1999, 21(2), 247-257; Cochrane Database Syst Rev, 2000, (2), CD000448; Drugs Aging, 2000, 16(3), 189-197).

<28> 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물과 이미프라민(imipramine)의 약효를 비교한 연구에서, 우울증 치료에 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물이 이미프라민과 동일한 정도의 효과를 보이면서도 부작용은 더 적음이 보고되었고(BMJ, 2000, 321, 536-539) 또한, 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물이 인간 시토크롬 P450 효소 활성(human cytochrom P450 enzyme activity)을 억제할 가능성이 있음이 보고되었다(J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(1), 88-95).

<29> 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물에는 중추신경계(CNS)에 직접 또는 간접적으로 작용하는, 구조적으로 차이가 있는 많은 수의 화합물들이 포함되어 있다. 즉, 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물은 실제 하이페리신(hypericin), 하이퍼포린(hyperforin) 등과 같은 활성화합물들 및 이량체 플라본류(dimeric flavones)가 포함되어 있으며, 이들은 동물 및 인간에 있어서 항우울작용 및 불안해소작용을 갖는 것으로 알려져 있다.

<30> 그 작용기전을 살펴보면, 하이페리신은 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물 중에 함유된 이량체의 프로시아니딘(dimeric procyanidines)의 존재 하에서 항우울 작용이 입증되었고(Regensburg, Germany, V. Butterwecke et.al., 45차 Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 1997, Abstract No. 011), 하이퍼

포린(hyperforin)은 마우스의 시상하부(hypothalamus)와 해마에서의 5-HT(serotonine) 농도를 상승시키는 것으로 보고되어 하이퍼포린(hyperforin)의 항우울 효과는 세로토닌 시스템과 관련되는 것으로 추정된다(J Pharm Pharmacol, 2001, 53(5), 583-600; Pharmacopsychiatry, 2000, 33(2), 60-65). 그러나, 우울증 환자들 중에는 기존의 항우울제로 치료가 되지 않는 환자가 약 20%나 존재하고 SSRI 등 최근 개발된 항우울제들의 부작용도 기존 항우울제에 비해 상대적으로 덜 하지만 여전히 무시할 수 없는 수준이다.

<31> 한편, 우울증의 치료를 위한 항우울제의 개발 과정에서 다양한 우울증 동물 모델들이 시도되어 왔다. 초기에는 강한 발 쇼크(intense foot-shock), 찬물 침례(cold water immersion), 48시간 먹이 또는 물 박탈(48h food/water deprivation) 등과 같은 강한 강도의 자극을 주는 방법이 선호되었으나, 최근에는 약하면서도 지속적이고 만성적인 스트레스를 받는 현대 인간의 일상을 더욱 잘 모사할 수 있는 경미한 강도의 반복적인 스트레스를 이용하는 방법이 선호되고 있다 (Psychopharmacology, 1984, 83, 1-16). 그 중에서도 윌너(Willner) 등이 제안한 만성적이고 약한 자극(Chronic Mild Stress, 이하 'CMS'라 약칭함) 모델이 신뢰도와 타당도를 갖춘 우수한 우울증 동물모델로서 인정받고 있다(Neuroscience and Biobehavioral Review, 1981, 5, 231-246; TIPS, 1991, 12, 131-136).

<32> 만성적이며 온화한 스트레스를 받은 랫트(Chronic mild stressed rat)는 만성적이고 약한 자극(CMS)에 의해 유발된 행위적 변화가 몇 주간의 지속적 투약기간 동안 관찰되어지고 이것이 습관적으로 일어나지 않거나, 그 습관화가 일정한 한도



적 범위내에서 일어날 수 있는 경우를 말한다(Psychopharmacology, 1997, 134, 319-320). 일반적 실험에서는 24시간 광주기(overnight illumination), 일정기간 먹이 또는 물 박탈(periods of food and/or water deprivation), 케이지 경사(cage tilt), 케이지 배우자의 변화(change of cage mate) 등과 같은 다양한 만성적이고 약한 자극원이 이용된다(Psychopharmacology, 1997, 134, 319-320). 이와 같은 스트레스 절차를 반복하면 흰쥐들은 우울증의 대표적 증상이라고 볼 수 있는 무쾌감증에 상응하는 증상으로, 자당용액(sucrose solution)의 섭취량에서 상당한 감소를 보이게 된다. 이러한 섭취량의 감소는 아무런 처치를 하지 않을 경우에는 CMS 절차를 철회하고 난 후에도 수 주간 지속되는 것으로 알려져 있다. 다수의 항우울제들은 CMS 처치에 따른 자당섭취량의 감소를 원래 수준으로 회복시켜 주는데 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다(Psychopharmacology, 1992, 109, 433-438).

<33>            한편, 연자육(蓮子肉)은 연꽃의 성숙한 열매 껍데기를 제거한 종자로서, 그 내부에 녹색 연심(蓮心)이 있다. 냄새는 없고 달고 산뜻하며 약간 푹다.

<34>            연자육은 다량의 전분과 라피노스(raffinose)라는 당을 함유하고 있으며, 약리작용으로는 비장과 위장의 기능 강화, 수면불안, 피부미백, 염증완화작용, 피부상처치유 등의 효과가 알려져 있다. 그러나, 지금까지 연자 열수 추출물을 이용한 우울증 증상의 완화에 관련한 어떠한 보고도 없는 실정이다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<35>            본 발명의 목적은 열수 추출에 의한 항우울 활성을 갖는 연자육 추출물, 이

를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물 및 건강식품을 제공하는 것이다.

### 【발명의 구성】

<36>           상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 연자육을 물로서 열수 추출한 엑기스를 농축 건조하여 얻은 연자육 추출물 및 이 연자육 추출물을 유효성분으로 포함하는 우울증을 치료하기 위한 약학적 조성물과 건강식품을 제공한다.

<37>           본 발명자들은 예로부터 연자육이 민간약으로 사용되어 왔음을 착안하여 연자육 추출물의 약리활성을 조사함으로, 연자육 추출물이 기존의 항우울제로 사용되는 하이페리쿰 피포라툼의 추출물과 근래 가장 많이 사용되어지는 항우울제인 SSRI 중의 하나인 플루옥세틴(fluoxetine; 제품명-프로작(Prozac))보다도 더욱 우세한 항우울 효과를 나타냄을 동물행동학적 방법에 의해서 밝혀내고 이들이 가지는 부작용을 최소화 하는 본 발명의 연자육 추출물로된 우울증 치료용 약학적 조성물을 제공하게 되었다.

<38>           또한, 본 발명의 연자육 추출물에 대해 항우울 메커니즘과 항우울제의 또 다른 효과인 면역 기능의 정상화를 분자생물학적, 생화학적 방법을 통해 밝혀내어 본 발명의 연자육 추출물로된 우울증 치료용 약학적 조성물을 제공하게 되었다.

<39>           더욱이 본 발명의 연자육 추출물은 기존 항우울제와 같은 부작용이 없음을 동물 행동학적인 방법을 통해서 밝혔다.

<40>           따라서, 본 발명은 항우울 활성을 갖는 연자육 열수 추출물을 제공한다.

<41>           또한, 본 발명은 상기 연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증 치료

용 약학적 조성물을 제공한다.

<42> 또한, 본 발명은 상기 연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증 치료 용 건강식품을 제공한다.

<43> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<44> 본 발명은 연자육을 물로서 열수 추출하여 제조되는 항우울 활성을 갖는 연자육 추출물로 이루어진다. 물로서 열수 추출을 하게 되면, 경제성과 공정상 편의성을 가지며, 또한 연자육 추출물을 이용한 액상 제제의 생산시 액상 제제의 주성분이 물이기 때문에 더욱 잘 용해될 수 있다는 장점이 있다. 상기 물은 불순물이 함유되지 않은 증류수(distilled water), 특히 3차 증류수를 사용하는 것이 바람직하다.

<45> 또한, 상기 열수 추출은 80 내지 100℃에서 1 내지 3시간 동안 이루어지는 것이 바람직하다. 열수 추출의 온도가 80℃ 보다 낮거나 시간이 1시간 보다 짧은 경우에는 연자육 추출물의 유효성분이 잘 용출되지 않으며, 온도가 100℃ 보다 높거나 시간이 3시간을 초과하게 되면 연자육 추출물의 유효성분이 분해될 수도 있기 때문에 상기 온도와 시간의 범위에서 열수 추출하는 것이 바람직하다.

<46> 또한, 본 발명은 상기 열수 추출 후, 연자육 추출여액을 여과하여 농축하는 단계와 동결건조하는 단계를 더 포함한다.

<47> 또한, 상기 열수 추출은 환류 추출로 하는 것이 바람직하다. 열수 추출 환류

추출과 가압증류법 등이 있으며, 특히 환류 추출이 바람직하다.

<48>

본 발명자들은 본 발명에 의한 연자육 추출물이 항우울 활성을 갖는지 확인해 보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 이를 위하여 본 발명의 연자육 추출물을 흰쥐에 하루(급성효과) 혹은 6일(만성효과) 투여한 후 각각 그 다음날에 강제수영(forced swim test)을 실시하였다. 강제수영시키는 동안 머둥거림을 멈추고 사지를 전혀 움직이지 않는 시간(immobility time)을 측정하였다. 이 강제수영은 바로 그 자체가 우울증을 유발시키는 실험으로 보통 수조안에 들어간 쥐는 얼마 동안 사지를 머둥거리다가 전혀 사지를 움직이지 않은채 물에 떠 있는 상태가 되는데, 이때 동물들은 절망적인 상태가 되어 거의 삶을 포기하는 상태가 된다. 이때를 우울증이 유발된 상태라 하는 데 보통 이러한 상태를 지속하는 시간을 대부분의 항우울제들은 유의성 있게 감소시키는 것으로 알려져 있다.

<49>

그러므로, 이러한 원리를 이용하여 약물의 항우울 효과를 측정하는 것이다. 약물을 투여하기전 미리 실험 동물을 수조안에 빠뜨려 15분 동안 강제수영을 하게하여 실험 동물들이 너무 갑작스런 환경 변화에 두려워 하지 않고 적응할 수 있도록 훈련을 시킨다. 약물을 투여하고 강제수영을 시킨 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명의 연자육 추출물은 항우울 활성을 나타내며, 아울러 비교군으로 사용한 하이페리쿰 피포라툼 추출물, 플루옥세틴 보다 하루 처리했을때 항우울 효과가 각 약물들의 유효용량 범위내에서 비교했을때 연자육 추출물에서만 유의성 있게 쥐의 비활동성 시간이 줄어드는 강력한 항우울 효과를 확인하였으며, 또한 도 2에

도시한 바와 같이, 각 약물들을 6일 처리 했을때 각 약물들의 유효용량 범위내에서 연자추출물이 가장 강력한 항우울 효과를 나타내었다.

<50> 또한, 본 발명의 연자육 추출물이 항우울 활성과 기존 항우울제의 대표적인 부작용인 성기능 장애를 극복하는지를 다음과 같이 시험해 보았다. 즉, 현실적 상황에 적용될 수 있는 상술한 우울증모델인 CMS를 이용하여 랫트에게 8주동안 우울증을 유발시킨 후, 자당섭취량이 감소하는 쾌감을 못 느끼는 무쾌감증 상태인 우울증 상태에 있다는 것을 확인 한 후 CMS가 진행되는 마지막 4주동안 항우울제로 사용되는 푸로작과 하이페리쿰 퍼포라툼의 추출물 및 본 발명의 연자추출물을 투여하여 항우울 효과와 그에 따른 부작용을 행동검사를 통하여 체중변화, 자당 섭취량 및 개방장에서의 활동을 약물처리 후 집단 간 비교를 통한 그 변화를 관찰함으로써 객관적으로 비교하였으며, 또 대표적인 SSRI계 항우울제 투여시 나타나는 부작용인 성적행동(Sexual Behavior)의 감소가 상기 약물의 투여에 따라서 어떻게 나타나는지 교미행동을 통하여 비교한 결과, 본 발명의 연자육 추출물은 비교군으로 사용한 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물과 푸로작보다 우수한 항우울 활성을 나타내면서도, 아울러 상기 종래 약물의 부작용인 성적행동감소를 전혀 보이지 않아 종래 항우울증 약물의 부작용이 없는 것으로 판단되었다.

<51> 더욱이, 본 발명에 따른 연자육 추출물의 항우울 메커니즘을 다음과 같이 생화학적인 방법으로 확인해 보았다.

<52> 먼저, 만성 CMS모델에서 미세투석과 HPLC-ECD방법을 이용하여 5-HT와 NE의

변동에 미치는 후보 약물의 효능을 검증하였다. 카테콜라민(Catecholamine)의 함량은 전기화학적 검침자(electrochemical detector)가 장착된 HPLC를 이용하여 분석한다. 이동상의 구성성분은 0.05M 모노베이식 소듐 포스페이트(monobasic sodium phosphate), 0.1N 소듐 아세트 아세테이트, 1% 메탄올이며 HPLC용 인산으로 pH를 4.4가 되도록 조절한다. DA는 LC-18 가아드 칼럼(guard column)으로 보호된 Supelcosil LC-8-DB 3- $\mu$ m 칼럼(150x4.6 mm, Supelco, Bellefonte, PA)에 의해 이루어진다. 이 시험 결과, 본 발명의 연자육 추출물은 비교군으로 사용한 푸로작처럼 신경전달 물질인 5-HT 양을 유의성 있게 증가시켰다.

<53> 두 번째로 우울증에 주요하게 관여하는 곳으로 알려진 랫트의 뇌부분 전전두엽, 해마, 시상하부에서 세로토닌 리셉터 1A 어고니스트(serotonin receptor 1A agonist)인 [ $^3$ H]-8-OH-DP을 이용한 수용체의 결합을 분석하여, 결합 증감을 통한 항우울작용을 표식을 통해 확인은 다음과 같이 행하였다. 8주간 CMS를 주고 마지막 4주간 약물 투여한 랫트들의 전체뇌를 분리해 드라이아이스에 넣어 급속냉동시킨다. 이렇게 급속냉동된 뇌는 절편을 만들기 전까지 -70°C에 보관한다. 냉동 절편기(Leika)를 사용하여 -20°C에서 뇌 절편을 20 $\mu$ m의 크기로 자른 후, 젤라틴으로 코팅된 슬라이드(Superfrost/Plus, Fisher Scientific) 글라스에 붙인다. 이렇게 만들어진 슬라이드는 5-HT1A 수용체의 변화를 관찰하기 위해 사용되기 전까지 -70°C에 보관한다. 5-HT1A 수용체의 변화는 방사선 동위원소인 [ $^3$ H]-8-OH-DPAT을 사용하여 관찰한다. 미리 만들어진 슬라이드는 -70 °C에서 꺼내어 실온에서 Tris-HCl 버퍼

(Tris 170 mM, CaCl<sub>2</sub> 4mM, pH 7.6)에 30분동안 담구어 선배양(pre-incubation)시킨다. 선배양이 끝난후, 1시간 동안 Tris-HCl 버퍼에 2nM의 [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT (Amersham)을 섞은 용액에 담구어 배양(incubation)시킨다. 이것은 5-HT<sub>1A</sub>수용체 전체의 변화 관찰을 위한 토탈 바인딩(total binding)이며, 비특이적 결합은 1μM의 5-HT(Sigma)를 상기의 배양시 사용되어진 용액에 첨가하여 관찰한다. 전체적인 수용체의 변화와 비특이적 결합을 위한 각각의 배양이 끝나면, 4℃의 Tris-HCl버퍼에서 6번 씻어 낸 후, 차가운 바람을 이용하여 건조 시킨다. 건조후 24시간 동안 데시게이터함에 넣어 완전히 건조시킨다. 완전히 건조된 슬라이드와 밀도를 알 수 있게 해주는 표준막대종이를 사용하여 하이퍼필름(Hyperfilm)에 5주 동안 노출시킨다. 현상액과 고정액을 사용하여 5주 동안 노출시킨 필름을 현상한다. 정량적인 밀도의 분석은 이미지 분석프로그램인 ImageQuant(Molecular dynamics)를 사용하여 스캔 후 분석한다. 각각의 대조군과 비교하여 결합의 증감을 통한 항우울작용 표식을 확인한 결과, 본 발명의 연자육 추출물은 비교군으로 사용한 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물처럼 세로토닌 리셉터 1A 어고니스트인 [<sup>3</sup>H] -8-OH-DPAT의 결합을 위에서 언급한 뇌의 세부분에서 모두 증가시켰다.

<54> 세 번째, 우울증에 주요하게 관여하는 랫트들의 해마부위에서 항우울작용의 표식들인 여러 단백질의 증가를 2-DE를 통해서 단백질 수준에서 확인은 다음과 같이 행하였다. 8주간 CMS를 주고 마지막 4주간 약물투여한 랫트들의 해마를 분리해 초음파 처리기(sonicator)로 현탁(suspension)한 후 원심 분리 후 상층액만 걷어냈

다. 각각의 샘플을 IEF 샘플 완충액을 넣는다. IEF 겔을 이용해 각 샘플을 등전점 (isoelectric point)에 따라 분리한다. SDS-PAGE에 러닝된 IEF 겔을 적하한 후 100-200V에서 1-2시간정도 러닝하여 분자량에 따라 샘플들을 분리한다. 겔-코드 블루 스테이닝(Gel-Code Blue staining)방법을 이용하여 겔을 스테이닝하여 항우울 물질에 의해 증가되거나 새로 나타나는 단백질을 확인한다. 질량 스펙트로메터 (Mass-spectrometry)로 항우울 물질에 의해 증가되거나 새로 나타나는 단백질을 동정한다.

<55>           그 결과, 본 발명의 연자육 추출물은 푸로작과는 다르게 아데닐석시닐 신시 타제(adenylsuccinyl synthetase), 시토크롬 C 옥시다제(cytochrome C oxidase), 엠에이피 키나제 2(MAP kinase 2), 알데하이드 디하이드로제나제 1(Aldehyde dehydrogenase 1)의 4개의 모든 단백질양을 증가시켰다.

<56>           또한, 본 발명은 상기와 같은 연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울 증 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<57>           본 발명의 우울증 치료용 약학적 조성물은 상기 연자육 추출물을 유효 성분 으로 함유한다. 상기 연자육 추출물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

<58>           즉, 본 발명의 연자육 추출물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량 제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여



조제된다.

<59> 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 연자육 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘(Magnesium stearate), 탈크(talc) 등과 같은 활택제들도 사용된다.

<60> 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀(liquid paraffin) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

<61> 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 올리브 오일(olive oil)과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트(ethyl oleate)와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골(macrogol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<62> 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

<63> 우울증 치료용 약학적 조성물에서, 연자육 추출물의 유효용량은 30 내지 700 mg/kg이고, 바람직하기로는 100 내지 500mg/kg이며, 하루 1-6 회 투여될 수 있다. 단, 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

<64> 본 발명의 연자육 추출물을 흰쥐에 경구 투여, 복강 내 투여 및 피하 주사시의 독성 실험을 수행한 결과, 복강 내 투여 독성시험에 의한 50% 치사량(LD50)은 적어도 연자육 추출물 20g/kg 이상인 안전한 물질로 판명되었다.

<65> 또한, 본 발명은 상기와 같은 연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증 치료용 건강식품을 제공한다.

<66> 본 발명의 추출물을 식품으로 사용할 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 추출물을 식품 또는 음료의 제조시에 원료에 대하여 0.01 내지 1중량%, 바람직하게는 0.1 내지 1중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명의 추출물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

<67>           상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 보혈제, 보양제, 피부미백제 등을 목적으로 하는 민간 요법제 등을 들 수 있다. 또한, 열다한소탕(熱多寒少湯), 청심산약탕(淸心山藥湯), 태음조위탕(太陰調胃湯) 등과 같은 여러 한의학 처방들에도 사용할 수 있다.

<68>           이하, 본 발명을 첨부도면을 참고하여 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<69>           <실시예1> 연자육 추출물의 제조

<70>           연자육 건조물 분말 500g을 3차 증류수 1ℓ가 담긴 플라스크에 넣고 100℃에서 1시간 동안 환류 추출에 의한 열수 추출을 하고, 거즈로 여과한 여액을 감압여과기(Eyela, Japan)로 농축한 후, 동결 건조하여 본 발명의 연자육 추출물을 제조하였다. 그 결과, 106g의 건조 추출물을 얻었다.

<71>           <실험예 1> 연자육 추출물을 이용한 항우울 동물행동실험

<72>           생후 85-90일 된 스프래그-다우리(Sprague-Dawley)종 수컷 랫트에 본 발명의

연자육 추출물을 경구 투여하였으며, 비교군으로는 항우울제로 사용되는 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물을 경구투여하였고 플로옥세틴은 복강투여하였다. 이들을 실험에 따라 하루 혹은 6일 투여하였다.

<73> 약물 투여전 원통모양의 수조(직경 20cm - 물의 깊이 40cm)에 흰쥐를 집어넣고 15분간 강제 수영시키고 약물 투여 하루 혹은 6일후 그 다음날에 5분간 강제 수영시키는 동안 사지를 전혀 움직이지 않는 시간을 측정하였다.

<74> 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 각 약물을 하루투여 후 강제 수영시키는 동안 사지를 전혀 움직이지 않는 시간은 대조군과 비교하여 볼 때 비교군인 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물과 플로옥세틴은 각각 1.5%, 9.3% 감소를 보였으나 유의성은 없는 반면, 연자육 추출물은 30.6%의 유의성 있는 감소를 보였다.

<75> 또한, 도 2에 도시된 바와 같이, 각 약물을 6일 투여 후 강제 수영시키는 동안 사지를 전혀 움직이지 않는 시간은 대조군과 비교하여 볼 때 비교군인 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물과 플로옥세틴은 29.6%, 22.1% 유의성 있는 감소를 보였으나 연자육 추출물은 보다 유의성 있는 34.3%의 감소를 보였다.

<76> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 연자육 추출물은 항우울 활성을 나타내며, 아울러 비교군으로 사용한 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물이나 플로옥세틴보다 각각 약물의 유효용량 범위내에서 항우울 효과가 뛰어남을 확인하였다.

<77> <실험예 2> 연자육 추출물을 이용한 CMS하에서의 항우울 동물행동실험

<78> 생후 6주된 위스타(Wistar)종 흰쥐 수컷180-200g의 동물을 구입하여, 실험집단과 통제 집단의 쥐들을 먼저 48시간 동안 1% 자당용액에 노출시켜 단맛에 대해 적응시킨 다음, 사흘 후부터 실험집단에 총 8주 동안 CMS 처치를 가하였다. 실험집단의 동물에게 가한 CMS절차는 Willner등(1987)의 절차를 사용하였다. 쥐들에게 여러 가지 경미한 스트레스를 연속적으로 가하는데 일련의 스트레스를 한 주일 동안 적절히 배분하여 시간표에 따라 처치하고 그 절차를 8주 동안 반복하였다.

<79> 스트레스 절차는 하기 표 1에 예시된 CMS 주간 스케줄과 같다(물먹이 박탈 20시간, 물먹이 박탈 후 급식제한(45g가루를 뿌려줌), 물박탈 후 빈물병 노출, 온종일 조명, 사육상자 30도 기울임, 물 400ml를 부어 사육환경을 오염시킴, 간헐적인 85dB 백색잡음 제시, 번쩍이는 스트로보스코프(Stroboscope)조명제시, 3배수 집단 사육). 통제 집단의 쥐들은 매주 자당 섭취량 측정 이전 20시간동안 물. 먹이 박탈만 시키고 나머지 기간 동안은 개별 사육상자에서 정상적으로 사육하고, 물과 먹이를 충분히 공급한다. 자당 용액 섭취량의 측정을 위해 일주일에 한번 물먹이 박탈을 하는 것과, 실험동물들의 CMS절차상의 박탈 스케줄을 제외하는 경우에는 물과 먹이를 마음대로 먹을 수 있게 공급하였다.

<80> [표 1]

	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu
am.1	물먹이	Tripled			먹이 박탈		
2	박탈	housing			soiled cage	Strobos.	Strobos.
3			White	White			
4		White	noise	noise			
5		noise					
6			White	noise		White	
7						noise	Strobos.
8							
9			Strobos.	먹이 박탈	powdered	Light ON	
10				soiled	food	Tilt	
11				cage		Empty bottle	White
12		Tilt			물박탈		noise
pm.1					Strobos.		
2	Sucrose Intake측정		Strobos.				
3							
4	Tripled						몸무게측정
5	housing						
6							물먹이 박탈
7		White	White				
8		noise	noise				
9					Light OFF	Light OFF	
10					White noise	Strobos.	
11		White	White				
12		noise	noise				

<82> <약물의 투여>

<83> CMS 진행 후 자당섭취가 CMS를 안준 것과 비교 후 자당 섭취가 유의성 있게 감소(우울증의 대표적인 증상)되면 본 발명의 연자육 추출물을 경구 투여하였으며, 비교군으로는 항우울제로 사용되는 하이페리쿰 피포라툼 추출물을 경구투여하였고 플로옥세틴은 복강투여하였다.

<84> <행동검사>

<85> (1)자당섭취량 및 체중의 측정

<86> 전술한 4집단 모두에 대해 매주 한 차례씩 1 % 자당 용액 섭취량을 측정하였다. 20 시간동안 물 먹이를 박탈한 상태에서 1% 의 자당용액과 물이 들어 있는 병을 각각 동시에 1시간 동안 노출시켰으며, 노출 전과 후의 용기 무게를 기록함으로써 자당용액 및 물의 섭취량을 측정하였다. 이후 물과 자당용액 섭취 총량에 대한 자당용액 섭취량의 비율로 자당용액 선호성을 산출하였다. 또한 자당용액의 섭취량을 CMS군과 비교하여 CMS군에서 우울증이 일어 났는지 측정하였다. 각 집단의 자당용액 섭취량은 시작부터 총 8주간 측정되었다. 체중은 매주 자당섭취량을 측정하기 위해서 실시하는 물먹이 박탈 20시간 스케줄이 시작되기 전에 측정하였다.

<87> 자당용액 섭취결과, 도 3의 (A)에 도시된 바와 같이, 처음 시작 할때는 자당 섭취량에 아무런 유의적인 변화가 감지되지 않았으나, 도 3의 (B)에 도시된 바와 같이, 5주 후부터 유의성 있게 CMS를 받은 그룹이 CMS를 받지 않은 그룹보다 자당용액 선호성이 16% 감소하였다. 이 표징은 우울증이 유발되었다는 것이다. 이 때부터 각각의 약물들을 4주간 투여한 결과, 도 3의 (C)에 도시된 바와 같이, 정상군을 대조군(CMS를 처리한 군)과 비교 했을때 대조군은 자당섭취량이 56%나 유의성 있게 감소하여 자당을 섭취함으로써 쾌감을 느끼는 정상적인 상태가 자당을 섭취해도 쾌감을 느끼지 못하는 무쾌감 증상의 우울증이 유발되었다는 것을 시사하며, CMS하에서 연자육 추출물, 하이페리쿰 피포라툼 추출물, 플로옥세틴을 4주간 투여했을 때 자당섭취량이 정상군과 비슷하게 회복됨을 알 수 있어 이들 모두 항우울 효과를 가지고 있음이 확인되었고, 연자육은 정상군의 자당 섭취량의 79%까지 회복됨을 알 수 있었다. 이는 연자육 추출물도 인간의 우울증을 잘 묘사할 수 있는 CMS모델하에

서 다른 두 대표적인 항우울제제와 비슷한 정도의 항우울 효과가 있음이 확인 되었다.

<88> 체중 측정결과, 도 4의 (A)에 도시된 바와 같이, 처음 CMS를 시작 할때는 그룹 4에서 보는 것처럼 전혀 그룹간에 차이가 없었으나, 8주간 CMS를 주고 마지막 4주간 약물을 투여한 결과 대조군(CMS를 준 것)은 정상군과 비교 했을 때, 상당한 차이로 몸무게가 줄었고 이는 보통 CMS하에서 일어난 우울증에서 흔히 나타나는 현상이다. 연자육 추출물 투여군만이 대조군의 몸무게와 비슷하게 회복되었으나 정상군처럼 회복되지는 않았다. 그러나, 도 4의 (B)에 도시된 바와 같이, 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물, 플로옥세틴 투여군에선 오히려 유의성 있게 대조군과 비교했을 때 몸무게가 줄었다. 이는 이들 약물들에 대한 심각한 부작용을 야기한다.

<89> 그러므로 연자 추출물은 기존 항우울제에서 나타나는 심각한 부작용 혹은 독성인 몸무게 감소를 회복시켜 기존 항우울제의 독성을 나타내지 않는 보다 안전한 약임을 입증하는 계기가 되었다.

<90> (2)개방장 활동(open field activity)

<91> CMS 처치와 각각의 약물 처치에 따른 활동량의 차이를 알아보기 위해, 9주 동안의 자당용액 섭취량 측정 절차가 모두 끝난 후에 개방장(open field)에서의 여러 가지 행동을 관찰하였다. 개방장은 75×75×30cm 규격의 나무로 만든 상자이며,



바닥에는 15cm 간격의 가로·세로선으로 바둑판 모양의 구획이 나뉘어져 있다. 개방장의 한쪽 편에는 15×15×15cm의 작은 상자가 연결되어 있어서, 실험동물이 개방장에 나가기 전 대기하는 출발상자로 이용된다. 출발상자와 개방장 사이는 내리닫이 문을 설치하여, 출발상자 안에 흰쥐를 넣고 30초 후에 문이 열리게 되며, 문이 열린 후 개방장으로 나갈 때까지 걸린 시간을 출발잠재기로 측정한다. 문이 열린 때부터 꼬리까지 완전히 출발상자를 벗어나올 때까지의 시간으로 정의한다. 출발잠재기의 종료와 동시에 개방장에서의 활동이 관찰되기 시작하는데, 개방장에서의 활동은 총 10분 동안 관찰되고, 그 동안 나타나는 보행활동(locomotion)과 앞발 들고 일어서기(rearing), 몸치장행동(grooming), 배변행동(defaecation) 등을 기록한다. 몸치장 행동은 그 횟수에 상관없이 10분 동안 몸치장에 소요한 총시간으로 측정하고, 나머지 행동 지표들은 모두 발생 빈도를 기록하였다. 보행활동은 흰쥐가 바닥에 그려진 15×15cm의 25개 구획을 지나갈 때마다 컴퓨터 트래킹 시스템(computer tracking system)을 이용하여 기록하였다. 일어서기는 총 10분 동안의 개방장 활동 중 뒷발로 서서 탐색행동을 보인 전체 횟수로써 기록되며, 몸치장행동은 앞발로 머리를 쓰다듬거나 입과 손으로 털을 고르는 행동을 전체 10분 동안 얼마나 보였는지에 대한 시간으로 기록한다. 10분간의 관찰이 끝나고 흰쥐를 개방장에서 꺼낸 후, 개방장 바닥에 남아있는 대소변의 개수를 셈하여 배변 횟수로 기록하였다.

지막 4주 각 약물처리 후 개방장 테스트를 통해 전체 방문한 방의 갯수 측정하면, 도 5에 도시된 바와 같이, 대조군(control group, CMS를 처리한 군, 10분 동안 평균 30개 장소 방문)과 비교해 연자처리 그룹이 방문한 방의 갯수가 가장 유의성 있게 증가(10분동안 평균 75개 장소 방문,  $P<0.05$ )하였다. 대표적인 항우울제인 푸로작(10분동안 평균 60개 장소 방문,  $P<0.05$ )이나 천연물인 세인트 존의 식물(10분동안 평균 50개 장소 방문,  $P<0.05$ )보다 우세한 항우울 효과가 확인된다. 이는 연자투여로 활동성이 활발해진 것이다. 즉, CMS에 의한 우울증 유발로 인한 활동성저하를 극복한 것으로 보여진다.

<93>

출발 잠재기(Start latency) 측정 결과, 8주 CMS 처리동안 마지막 4주 각 약물처리 후 개방장 테스트를 통해 개방장의 문을 열고 처음으로 개방장을 나간 시간을 측정하면, 도 6에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹만이 출발 잠재기가 유의성 있게 감소 ( $P<0.05$ ). 대표적인 항우울제인 푸로작이나 천연물인 세인트 존의 식물보다 우세한 항우울 효과가 확인되었다. 이는 연자투여로 출발 시간이 빨라진 것이다. 즉, CMS에 의한 호기심과 삶에 대한 의욕 저하를 극복한 것으로 보여진다.

<94>

앞발 들고 일어서기(Rearing) 측정 결과, 8주 CMS 처리동안 마지막 4주 각 약물처리 후 개방장 테스트를 통해 앞발 들고 걷는 횟수를 측정하면, 도 7에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹이 앞발 들고 일어서기 갯수(rearing

number)가 유의성 있게 감소( $P<0.05$ )하였다. 대표적인 항우울제인 푸로작보다 우세한 항우울효과가 확인되었다. 이는 연자투여로 새로운 주위환경에 대한 탐험심이 회복된 것이다. 즉, CMS에 의한 주위환경에 대한 호기심 및 탐험심 저하를 극복한 것으로 보여진다.

<95> 몸치장행동(Grooming) 측정결과, 8주 CMS 처리동안 마지막 4주 각 약물처리 후 개방장 테스트를 통해 자기 몸치장하는 시간을 측정하면, 도 8에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹이 몸치장행동 시간(grooming time)이 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ). 대표적인 항우울제인 세인트 존의 식물과 비슷한 항우울 효과가 확인되었다. 이는 연자투여로 자기 자신에 대한 관심이 회복됐다는 것을 의미한다. 즉, CMS에 의한 자기에 대한 관심 저하를 극복한 것으로 보여진다.

<96> (3)성행동(sexual behavior)

<97> CMS를 8주간 주고 자당 감소(우울증의 대표적인 증상)를 확인하고 항우울제를 4주간 투여한 후 쥐의 교미행동을 관찰한다. 검사 장소는 어둡하고 조용한 방에서 실시하였다. 16×16 inch 의 투명한 아크릴 상자를 사용한다.

<98> 검사를 실시하기 48시간 전에 난소가 절제된 성숙한 암쥐에 에스트라디올 벤조에이트(estradiol benzoate) 20  $\mu$ g을, 그리고 검사 5시간 전에는 프로게스테론(progesterone) 1mg을 투여하여 그 암쥐가 성적 수용성을 갖도록 한다. 숫쥐를 환

경에 익숙해지도록 매 30분 동안 상자 속에 혼자 놓아둔다. 그 뒤에 암쥐를 넣어주고 30분 동안 교미행동을 관찰한다. 암쥐의 성적 수용성이 갖추어진 경우, 즉, 발정한 경우, 숫쥐가 올라타도록 허용하고 척추 전만을 보인다. 숫컷의 성행동을 올라타기(mounting), 삽입(intromission), 사정(ejaculation)으로 구분하여 각각의 빈도를 측정하였다. 숫쥐가 30분 동안에 보여준 사정의 수(ejaculation number, 이 횟수가 많을 수록 성적능력이 더 있는 것으로 사료됨)를 기록하고 한번 사정한 다음 다시 사정할 때까지의 시간을 후사정 간격(post-ejaculation interval, PEI)이라 한다. 이 시간이 짧으면 짧을 수록 성적 능력이 더있는 것으로 사료된다.

<99>

난소 절제 후 에스트라디올(Estradiol)과 프로게스테론(progesteron)을 투여한 암컷과 실험동물을 합사시켜 30분 동안 사정 빈도를 측정하였다. 그 결과, 도 9에 도시된 바와 같이, 베히클(vehicle), 플루옥세틴(fluxetine), 세인트 존의 식물(St. John's wort) 투여동물의 성행동은 정상동물에 비해 현저히 감소되었으나 연자 투여동물의 성행동은 통제동물과 통계적으로 차이가 없었다. 이것은 CMS에 의해 억제된 성행동이 연자 투여에 의해 회복되었음을 보여주는 결과이다.

<100>

난소 절제 후 에스트라디올과 프로게스트론을 투여한 암컷과 실험동물을 합사시켜 30분 동안 처음 사정한 후 다음 사정까지 걸리는 시간을 측정하였다. 그 결과, 도 10에 도시된 바와 같이, 플루옥세틴, 세인트 존의 식물 투여동물의 성행동은 CMS 처리 동물(C)과 유의적 차이가 없었으나 연자 투여동물의 성행동은 통제동

물과 통계적으로 차이가 있었다. 즉, PEI가 유의하게 감소하였음을 보여주며 이것은 CMS에 의해 억제된 성행동이 연자 투여에 의해 회복되었음을 보여주는 결과이다.

<101> <실험예 3> 연자육 추출물을 이용한 만성 CMS하에서의 항우울 메커니즘 규명

<102> 정상적인 상태와 만성 CMS모델에서 미세투석과 HPLC-ECD방법을 이용하여 5-HT와 NE의 변동에 미치는 연자 추출물의 항우울 효능을 검증하였다. 이를 통해 항우울제 작용의 핵심인 직접적인 신경전달 물질의 증가유무를 확인 할 수 있다. 연자처리를 통한 직접적인 신경전달 물질의 증가유무를 확인하면, 도 11에 도시된 바와 같이, 정상동물에게 연자(100mg/kg, 400mg/kg, 1000mg/kg p.o.), 세인트 존의 식물의 추출물(500mg/kg, p.o.) 및 플루옥세틴(10mg/kg, i.p.)를 투여했을 때, 연자 500 및 1000mg 투여군에서 5-HT의 농도를 유의하게 증가시켰으며, 플루옥세틴(10mg/kg, i.p.)도 5-HT의 농도를 유의있게 증가시켰으며. 세인트 존의 식물(500mg/kg, p.o.)는 5-HT를 증가시키는 경향성은 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 정상적인 상태에서도 플루옥세틴에 비슷하게 세로토닌(serotonin) 농도를 증가시킨다는 것은 항우울제제로서의 효능이 있다는 것을 의미한다.

<103> 연자의 CMS우울증 모델에서 항우울효과를 검증하기 위하여 CMS를 8주 동안 되풀이하여 연속적으로 가한 후, 해마(hippocampus)에서 5-HT의 변동을 회복시키는 지 미세투석과 HPLC-ECD방법을 이용하여 검증한 결과, 도 12에 도시된 바와 같이, 8주동안 스트레스를 가했을때 해마의 5-HT농도가 CMS군에서 정상군에 비해 유의성

있게 줄었으며 연자를 투여한 집단중 1000mg/kg p.o.를 투여한 집단에서 CMS군과 비교했을때 5-HT를 유의성 있게 증가시켰으며 ( $p < 0.05$ ), 플루옥세틴 (10mg/kg, i.p.) 투여군은 CMS군과 비교했을때 5-HT의 농도를 유의성 있게 증가시켰다( $p < 0.05$ ). 세인트 존의 식물(500mg/kg, p.o.) 투여군에서CMS 통제군과 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이같은 결과는 CMS에 의한 동물 우울증 모델에서 연자가 항우울효과를 나타냄을 강력히 시사한다.

<104> 5-HT1A 수용체(receptor)의 변화는 방사선 동위원소인 [ $^3\text{H}$ ]-8-OH-DPAT을 사용하여 관찰한다. 5-HT1A 수용체의 감소 혹은 비활성은 우울증 환자 전전두엽, 해마, 시상하부등에서 나타나고 있는데 항우울제 투여로 이들 수용체의 수가 정상으로 되거나 다시 정상적인 활성화가 되는 것으로 알려져 있으며, 이에 의한 항신경성의 행동(neurotrophic action), 신경세포의 생존(neuronal survival) 등이 증가한다. 우울증에 의한 신경변성(neuro-degeneration) 치료 및 우울증 치료에 효과가 있다. 그러므로 이와같이 5-HT1A 수용체의 길항제(antagonist)를 통한 바인딩(binding)실험을 통해 5-HT1A 수용체의 증가 유무를 알 수 있다. 연자투여를 통해 CMS 대조군과 비교했을때 5-HT1A 수용체의 증가가 이루어진다면 이를 항우울효과의 생체내 분자적 수준의 표식으로 볼 수 있다. CMS와 더불어 8주 약물처리 후 5-HT1A 수용체 증가를 통한 연자의 생체내 항우울표식이 확인된다.

<105> 도 13에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹은 뇌의 해마, 시상하부(hypothalamus)에서 5-HT1A 수용체 길항제(receptor antagonist)를 이용한

바인딩 실험을 통해 5-HT1A 수용체 증가를 푸로작군과 비슷하게 확인된다.

(binding intensity: Red > yellow > green). 따라서, 연자투여에 따른 대표적인 항우울 표식인 5-HT1A receptor 증가가 확인된다.

<106>

만성 CMS 8주 처리 후 마지막 4주동안 각 약물처리 후 5-HT1A 수용체 증가를 통한 연자의 생체내 항우울표식 확인한 결과, 도 14에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹은 뇌의 해마 CA2 부분에서 5-HT1A 수용체 길항제를 이용한 바인딩 실험을 통해 5-HT1A 수용체 증가를 세인트 존의 식물 처리군과 비슷하게 확인된다(각각 14 %, 15 %증가). 그러나, 이와는 반대로 푸로작 처리군은 오히려 12% 감소하였다. 이는 연자의 다른 항우울 메커니즘 의미한다. 따라서, 연자투여에 따른 대표적인 항우울 표식인 5-HT1A 수용체의 증가가 확인된다. 연자투여는 기억력 저장과 장기기억(long term memory) 형성을 위해선 반드시 거쳐야 할 해마 CA2 부분의 5-HT1A 수용체를 증가시킨다. 이는 CMS로 인해 손상된 이 부분에 대한 회복을 의미한다. 그러나, 푸로작의 경우 오히려 반대 효과를 나타내므로 독성 및 부작용을 주의할 필요가 있다.

<107>

도 15에서 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹은 뇌의 해마 CA3 부분에서 5-HT1A 수용체 길항제를 이용한 바인딩 실험을 통해 다른 약물보다 우세한 5-HT1A 수용체의 증가가 확인된다(14% 증가). 그러나, 이와는 반대로 푸로작 처리군은 오히려 2% 감소하였다. 이는 연자의 다른 항우울 메커니즘 의미하며,

연자투여에 따른 대표적인 항우울 표식인 5-HT1A 수용체의 증가가 확인된다. 연자투여는 기억력저장과 장기기억 형성을 위해선 반드시 거쳐야 할 해마 CA3부분의 5-HT1A 수용체 증가를 나타내며, 이는 CMS로 인해 손상된 이 부분에 대한 회복을 의미하고 나아가 기억력 및 학습능력 저하를 치료할 것으로 예상된다. 그러나, 푸로작의 경우 오히려 반대 효과를 나타내므로 독성 및 부작용 주의를 할 필요가 있다.

<108>

도 16에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹은 뇌의 전면 대뇌피질(frontal cortex) I-II 부분에서 5-HT1A 수용체 길항제를 이용한 결합(binding) 실험을 통해 5-HT1A 수용체의 증가가 확인된다(11% 증가). 그러나, 이와는 반대로 푸로작 처리군은 연자군과 비교했을 때 오히려 46% 유의성 있게 감소( $P < 0.05$ ) 하였다. 이는 연자의 다른 항우울 메커니즘 의미한다. 즉, 연자투여에 따른 대표적인 항우울 표식인 5-HT1A 수용체 증가가 확인되며, 연자투여는 인지능력에 관여하는 뇌의 전면 대뇌피질 I-II 부분에서 5-HT1A 수용체를 증가시키며, 이는 CMS로 인해 손상된 이부분에 대한 회복을 의미하고 나아가 우울증으로 인한 인지능력 저하를 치료할 것으로 예상된다. 그러나, 푸로작의 경우 오히려 반대 효과를 나타내므로 독성 및 부작용 주의할 필요가 있다.

<109>

도 17에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹은 뇌의 시상하부 부분에서 5-HT1A 수용체 길항제를 이용한 바인딩 실험을 통해 5-HT1A 수용체 증가를 세인트 존의 식물 처리군과 비슷하게 확인하였다(각각 42%, 44%증가). 푸로작



처리군도 71% 증가하였다. 따라서, 연자투여에 따른 대표적인 항우울 표식인 5-HT1A 수용체 증가를 확인하였다. 연자투여는 우울증을 유발할 수있는 만성적인 스트레스에 가장 민감하게 반응하고 가장 손상(damage)를 입는 시상하부 부분의 5-HT1A 수용체를 증가시킨다. 이는 CMS로 인해 손상된 이 부분에 대한 회복을 의미한다.

<110>

일반적인 항우울제제의 투여는 세로토닌 양을 증가시켜 세로토닌 수용체를 증가 혹은 활성화시켜 그것의 다운 스트림(down-stream)인 아데닐 시클라제(adenyl cyclase)를 활성화를 시켜 cAMP를 증가시켜 이것은 PKA를 활성화 시키고, 나아가 CREB, BDNF와 그것의 수용체인 trkB, 또한 ERK(MAP kinase)의 단백질의 양을 증가시키는 것으로 보고되었으며, 이들에 의해 세포성장(cell growth) 혹은 세포생존(cell survival)에 관련된 유전인자들의 발현을 증폭시켜 이들에 의해 우울증으로 인한 신경세포 손상(neuronal cell damage)을 막고 신경세포(nerve cell)간의 소통(communication)과 적응성(plasticity)을 증가시키는 것으로 보고 되어 있다. 연자를 투여한 후 이러한 항우울 표식 혹은 이들과 직접적, 간접적으로 관련된 인자들의 발현 증가 혹은 발현 감소를 2-DE 시스템(system)을 통해 확인하여 연자의 항우울의 분자적 메커니즘을 규명할 수 있다. IEF(Isoelectric focusing) 겔(gel)을 이용하여 각 뇌 해마 샘플(brain hippocampus sample)을 등전점(isoelectric point)에 따라 분리하며, SDS-PAGE에 따라 이들을 다시 분자량에 따라 분리하고, MALDI-TOF를 이용해 연자 투여에 의한 증가되거나 감소되는 단백질을 확인한다.

<111> 도 18과 도 19에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교해 연자처리 그룹은 4개의 스팟(spot)이 증가한다. 이는 대조군은 물론이거니와 보통군(Normal group)과 비교해도 상당량의 세기(intensity)증가함을 알 수 있다. 이중 스팟 1과 스팟 2는 연자와는 반대로 세기가 감소됨을 알 수 있다. 연자처리군에 의한 특별한 생체내 표식이 발견된다. 4개 스팟 모두 세로토닌 증가에 따른 그 수용체의 활성화 하류부분(down-stream)에 관여하는 생체내 항우울표식과 관련이 있음을 알 수 있다.

<112> 스팟 1. 아데닐오석시네이트 신시타제(Adenylosuccinate synthetase)

<113> 아데닐오석시네이트 신시타제(Adenylosuccinate synthetase)는 AMP 생합성과정에 관여한다. 해마나 전두엽에서의 cAMP-감소 신호 변환 체계는 우울증의 병리학적 상태와 연관된다. 성장요소(Growth factor)에 의한 이 효소의 활성화가 보고된 바 있어 세로토닌 증가로 5-HT 수용체 활성화와 그에 따른 성장요소의 발현증가에 의한 이 효소의 발현 증가 및 활성화를 추측해 보면, 이 경우 아주 천천히 cAMP증가를 유도할 것으로 예상된다. 연자에 의한 긴시간에 걸친 cAMP증가는 약물 중독(drug addiction), 약제사용 중지예 의한 허탈 증상(withdrawal symptom)의 부작용 및 성적 기능장애(sexual dysfunction) 해소 가능성을 나타내며, 이와는 반대로 푸로작은 오히려 이 효소의 활성을 저해하는 것으로 나타나 이 효소의 활성화를 통한 간접적인 cAMP증가가 아닌 다른 것을 통한 cAMP 증가를 유발시키는 것으로 나타난다. 이는 cAMP의 직접적이고 빠른 증가를 의미하므로 너무나 빠르게 생리 시스템

(physiological system)을 변화시켜 약물 중독, 약제사용 중지에 의한 허탈 증상의 부작용 및 성적 기능장애를 야기할 것으로 추정된다.

<114> 스팟 2. 시토크롬 C 옥시다제 폴리펩타이드 VIa-리버, 미토콘드리아 프리커서(Cytochrome C oxidase polypeptide VIa-liver, mitochondrial precursor)

<115> 시토크롬 C 옥시다제(Cytochrome c oxidase)는 ATP 생성의 주요 효소로서 작용하고 미토콘드리아 세포내벽의 양성자 운반에 관여한다. 신경활동이나 ATP 레벨과 비례해서 변화한다. 신경활동이나 ATP의 저하는 시냅스의 신경전달 기능의 저하와 밀접한 연관이 있으며 우울증은 신경 전달 기능의 저하가 특징이므로 시토크롬 c 옥시다제 폴리펩타이드 VIa-리버(Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver)의 증가는 우울증의 개선을 나타낼 수 있다.

<116> 스팟 3. 미토젠-엑티베이트드 프로테인 키나제 1(Mitogen-activated protein kinase 1)(Extracellular signal-regulated kinase 2, ERK-2)

<117> ERK-2는 신경성장요소(Nerve Growth Factor)를 활성화 하는 것으로 알려졌다. 항우울제 투여에 의한 5-하이드록시트립타민(5-Hydroxytryptamine, 5-HT, serotonin)증가는 해마의 세로토닌 수용체의 활성화를 유도하며 새로운 시냅스 연결의 성장을 야기하며 세로토닌 수용체의 다운 스트림(down-stream)인 MAPK 활동을 증가시킨다. MAPK는 유전자 발현과 시냅스의 적응력, 리셉터의 기능과 신경

활동에서 중요한 역할을 한다. 이 효소는 또한 CREB과 같은 전사요소(transcription factor)를 활성화 시켜 신경세포 생존(neuronal cell survival)에 필요한 성장요소들을 만들어 내는 것으로 보고되어 있다. 여러우울증 환자는 5-HT 레벨의 감소에 의한 시냅스 연결의 자극 전달 저하를 보인다. 그러므로 우울증의 개선은 MAPK의 증가와 연관지을 수 있다.

<118> 스팟 4. 알데하이드 디하이드로제나제(Aldehyde dehydrogenase)

<119> 이 ALDH는 프럭토스(fructose), 아세트알데하이드(acetaldehyde), 옥살레이트 메타볼리즘(oxalate metabolism)의 중요 효소(key enzyme)로서 반응성 카르보닐(carbonyls)과 알데하이드(aldehyde)에 대한 독소제거 시스템을 대표하는 효소이다. 다운 증후군 환자의 뇌에서 ALDH 레벨을 조사한 결과 대조군에 비하여 절반 이하로 감소되어 있음이 확인되었으며, 이로 인해 신경전달 물질의 불완전한 분해에 의해 플라그(plaque)와 탱글(tangle)을 형성함으로써 뇌내 신경신호전달체계의 교란이 일어나고 있음이 발표되었다. 또한 ALDH 부족은 기능성이 부족한 5-HT 수용체의 돌연변이와 밀접한 관련이 있다. 그러므로 연자에 의한 이 효소의 활성화는 5-HT 수용체의 보호와 연관지을 수 있고 결국 5-HT 수용체의 보다 나은 활성화를 의미하고 이를 통한 보다 나은 항우울효과를 생각할 수 있다. 이와는 반대로 푸로작에 의한 이 효소의 감소는 또 다른 항우울 작용의 신경전달 물질인 NE의 감소를 가속화하고 또한 기능성이 부족한 5-HT 수용체의 돌연변이를 많이 야기시킬 수 있어 이것도 결국은 독성 및 부작용을 야기시킬 수 있다.

<120> <실험예 4> 랫트에 대한 경구투여 급성 독성실험

<121> 6주령의 특정병원체부재(specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 군당 5 마리씩의 동물에 본 발명의 연자육 추출물을 각각 0.5% 메틸셀룰로즈 용액에 현탁하여 각각 5g/kg, 10g/kg 및 20g/kg의 용량으로 1회 단회 경구투여 하였다. 시험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

<122> 그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 연자육 추출물은 모두 랫트에서 20g/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 따라서, 경구 투여 중간치사량(LD50)은 연자육 추출물 20g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

<123> <제제예 1> 연질캡셀제의 제조

<124> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 100.0mg, 콩기름 175.0mg, 황납 45.0mg, 야자경화유 127.5mg, 대두인지질 21.0mg, 젤라틴 212.0mg, 글리세린(비중 1.24) 50.0mg, 디-소르비톨 76.0mg, 파라옥시안식향산메칠 0.54mg, 파라옥시안식향산프로필 0.90mg, 메칠바닐린 0.56mg, 황색 203호 적량의 성분이 1 캡셀 중에 함유

되도록 약전 제제총칙중 연질캡셀의 제법에 따라 제조하였다.

<125> <제제예 2> 정제의 제조

<126> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 100.0mg, 옥수수전분 90.0mg, 유당 175.0mg, 엘-하이드록시프로필셀룰로오스 15.0mg, 폴리비닐피롤리돈90 5.0mg 및 에탄올 적량의 원료를 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 1.8 mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.

<127> <제제예 3> 캡셀제의 제조

<128> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 100.0mg, 옥수수전분 83.2mg, 유당 175.0mg 및 스테아린산 마그네슘 1.8mg의 원료를 균질하게 혼합하여 1캡셀에 360mg이 함유되도록 충전하였다.

<129> <제제예 4> 식품 및 음료의 제조방법

<130> 본 발명자들은 연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 또는 음료 조성물을 하기와 같이 제조하였다.

<131> <4-1> 츄잉껌의 제조

<132> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 0.24 ~ 0.64%, 껌베이스 20%, 설탕

76.36 ~ 76.76%, 후르츠향 1% 및 물 2%의 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 츄잉껌을 제조하였다.

<133> <4-2> 아이스크림의 제조

<134> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 0.24 ~ 0.64%, 유지방 10.0%, 무지유 고형분 10.8%, 설탕 12.0%, 물엿 3.0%, 유화안정제(스팬,span) 0.5%, 향료(스트로베리) 0.15% 및 물 63.31 ~ 62.91%의 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 아이스크림을 제조하였다.

<135> <4-3> 음료의 제조

<136> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 0.48 ~ 1.28mg, 꿀 522mg, 치옥토산 아마이드 5mg, 니코틴산아마이드 10mg, 염산리보플라빈나트륨 3mg, 염산피리독신 2mg, 이노시톨 30mg, 오르트산 50mg 및 물 200ml의 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 음료를 제조하였다.

<137> <4-4> 소세지의 제조

<138> 실시예 1에 따라 제조된 연자육 추출물 0.24 ~ 0.64%, 돈육 63.6%, 계육 27.5%, 전분 3.5%, 대두단백 1.7%, 식염 1.62%, 포도당 0.5% 및 기타첨가물(글리세린) 0.94 ~ 1.34%의 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 소세지를 제조하

었다.

<139>           이상 설명한 본 발명은 그 기술적 사상 또는 주요한 특징으로부터 벗어남이 없이 다른 여러가지 형태로 실시될 수 있다. 따라서, 상기 실시예는 모든 점에서 단순한 예시에 지나지 않으며 한정적으로 해석되어서는 안된다.

#### **【발명의 효과】**

<140>           상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 열수 추출에 의한 연자육 추출물은 매우 높은 항우울 활성을 나타내고 연자육 추출물의 원료인 연자육은 우울증 치료용 약학조성물로 사용할 때 인체에 무해하고 흡수율이 좋은 천연약재이므로 우울증과 관련된 각종 질환의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있다.



## 【특허청구범위】

### 【청구항 1】

연자육을 물로서 열수 추출하여 제조되는 항우울 활성을 갖는 연자육 추출물.

### 【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 열수 추출은 80 내지 100℃에서 1 내지 3시간 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는 항우울 활성을 갖는 연자육 추출물.

### 【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 열수 추출 후,

추출여액을 여과하여 농축하는 단계;

동결건조하는 단계를 더 포함하는 방법에 의해 제조된 것을 특징으로 하는 항우울 활성을 갖는 연자육 추출물.

### 【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 열수 추출은 환류 추출인 것을 특징으로 하는 항우울 활성을 갖는 연자육 추출물.

### 【청구항 5】

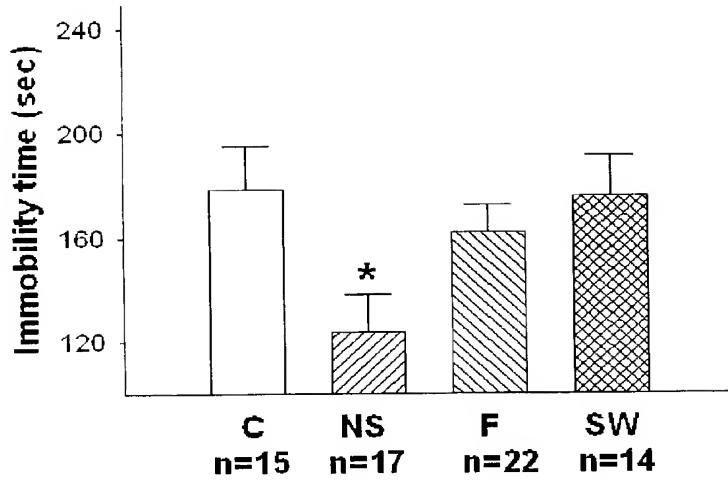
제 1항 내지 제 4항 중의 어느 한 항에 의해 제조된 연자육 추출물을 유효 성분으로 함유하는 우울증 치료용 약학적 조성물.

### 【청구항 6】

제 1항 내지 제 4항 중의 어느 한 항에 의해 제조된 연자육 추출물을 유효 성분으로 함유하는 우울증 치료용 건강식품.

【도면】

【도 1】

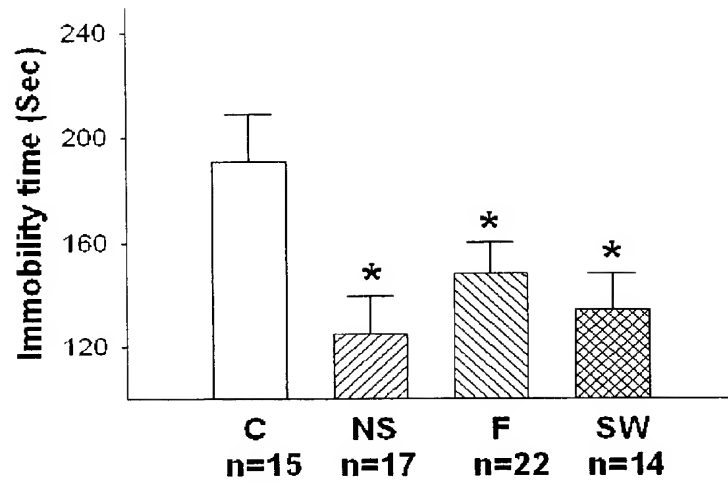


C: 대조군, NS: 연자처리군, F: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리쿰 퍼포라

툼 처리군

\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 2】

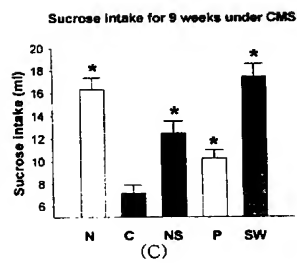
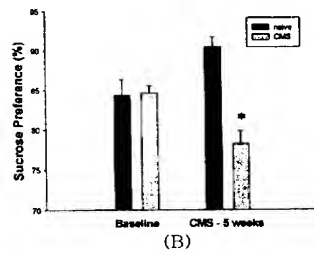
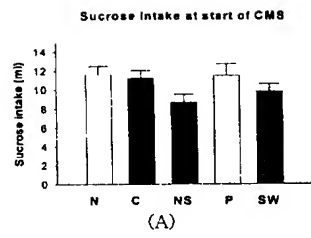


C: 대조군, NS: 연자처리군, F: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리쿰 퍼포라

- 처리군

\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 3】

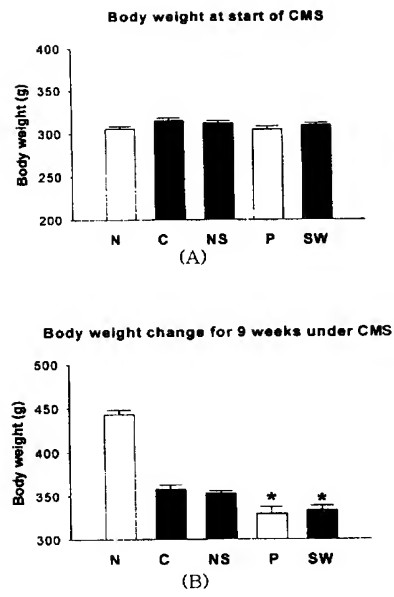


N: CMS를 처리하지 않은 정상군, C: CMS를 처리한 대조군, NS: 연자처리군,

P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리쿰 퍼포라툼 처리군

\* 대조군 혹은 정상군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 4】

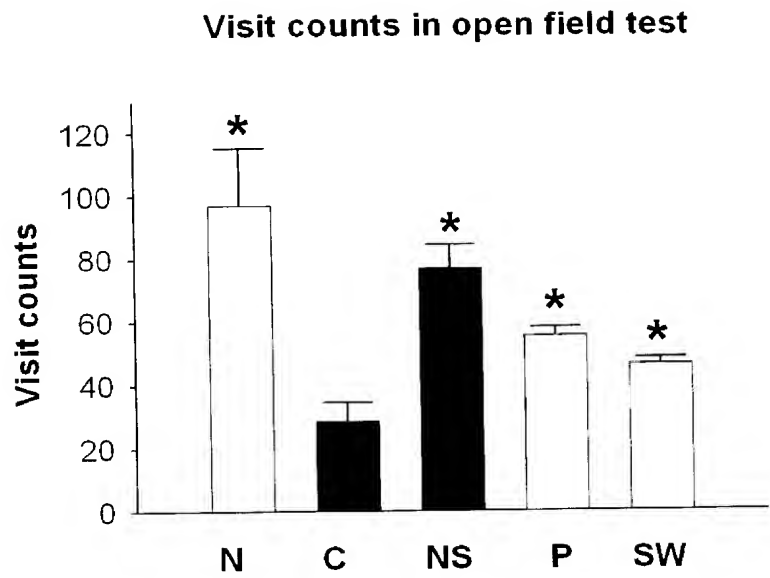


N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페

리쿰 퍼포라툼 처리군

\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 5】



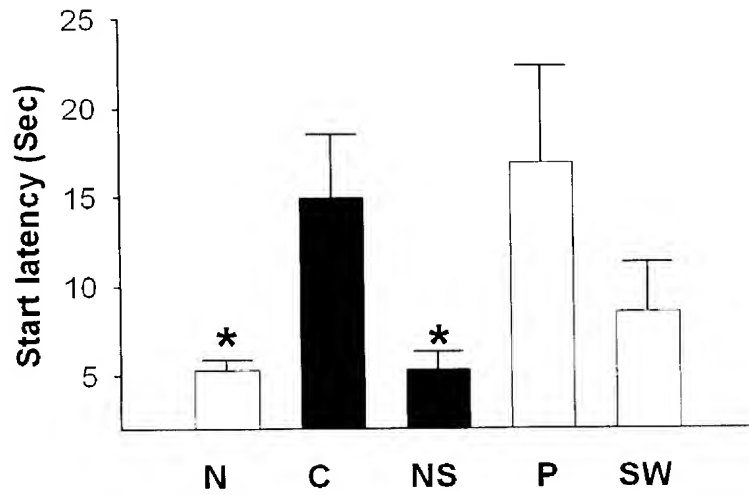
N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페

리쿰 퍼포라툼 처리군

\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 6】

Start latency in open field test



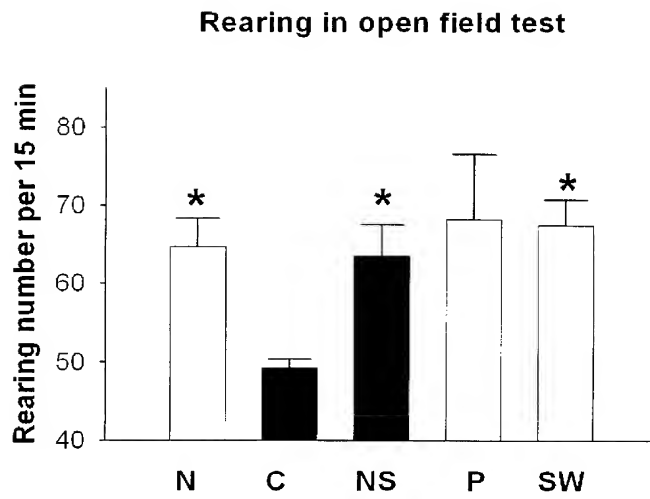
N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페

리콴 퍼포라툼 처리군

\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$



【도 7】

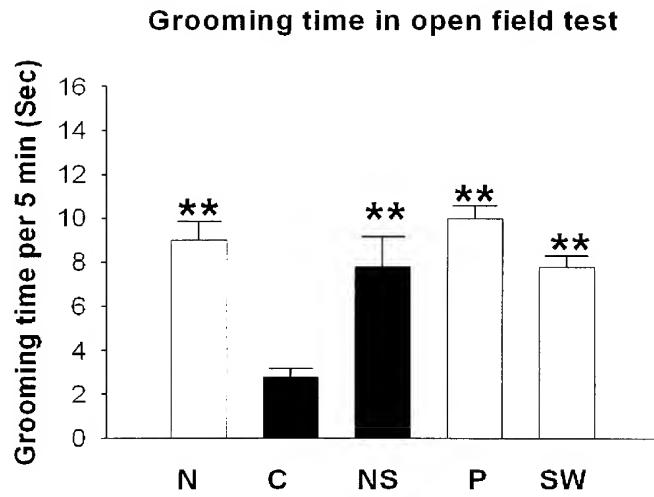


N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페

리움 퍼포라툼 처리군

\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 8】



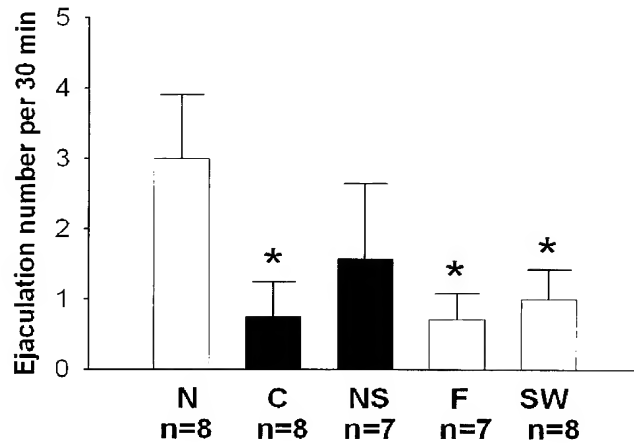
N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페

리움 퍼포라툼 처리군

\*\* 대조군과 비교 했을때  $P < 0.01$

【도 9】

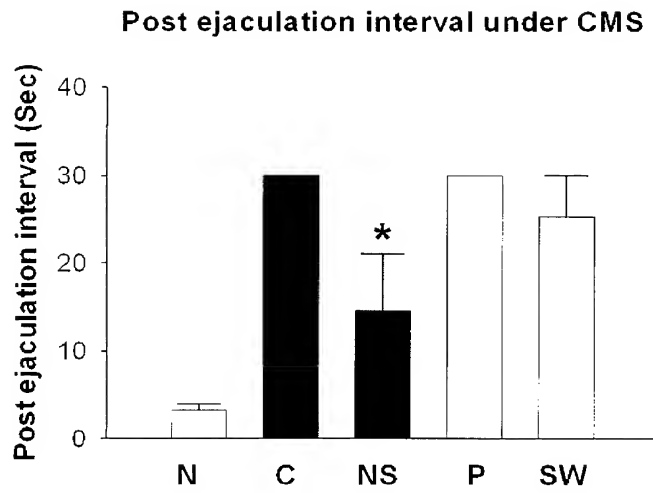
The effect of *Nelumbinis* Semen on sexual behavior



N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, F: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리움 피포라툼 처리군

\* 정상군과 비교 했을때  $P < 0.05$

【도 10】

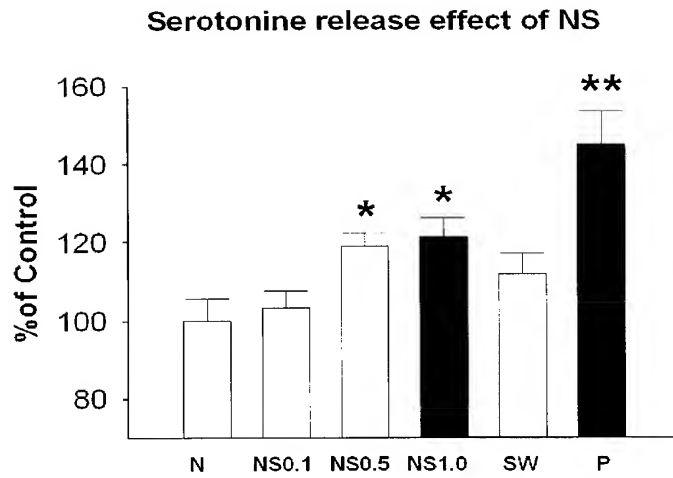


N: 정상군, C: 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페

리움 퍼포라툼 처리군

\* 정상군과 비교 했을때  $P < 0.05$

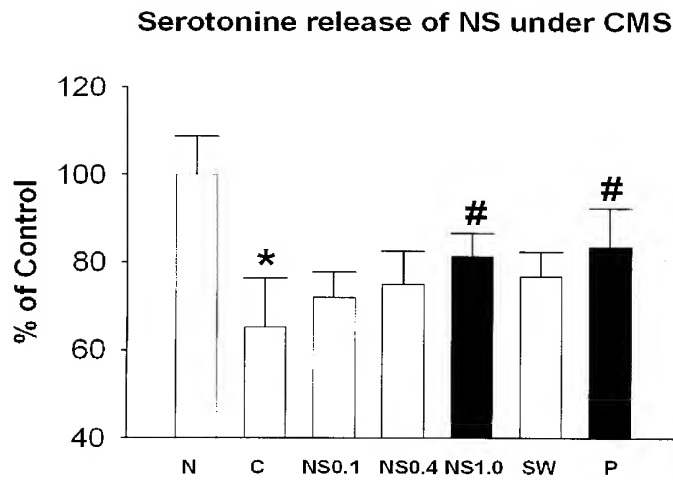
【도 11】



N: 정상군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리쿰 퍼포라  
툼 처리군

\* 정상군과 비교 했을때  $P < 0.05$ , \*\* 정상군과 비교 했을때  $P < 0.01$

【도 12】

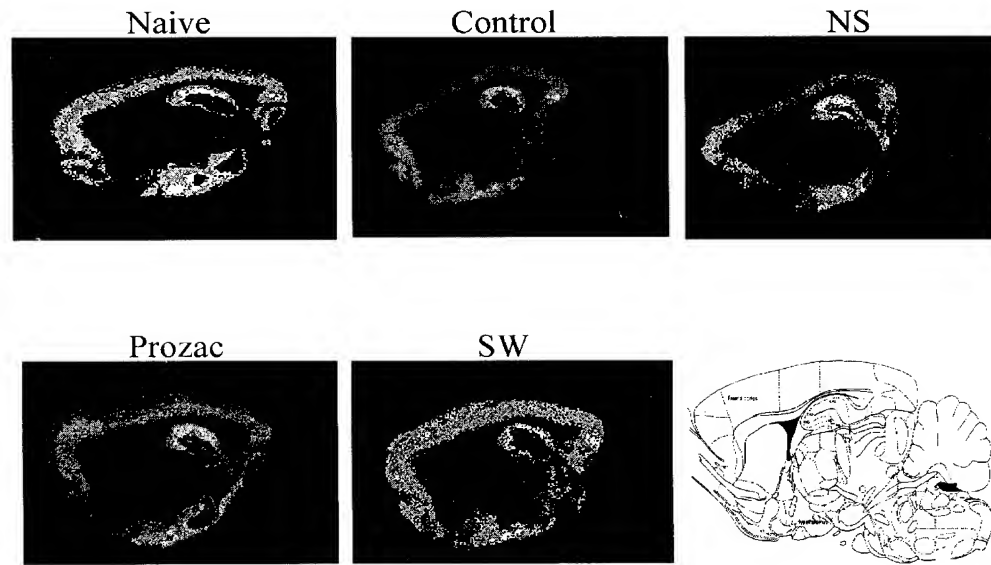


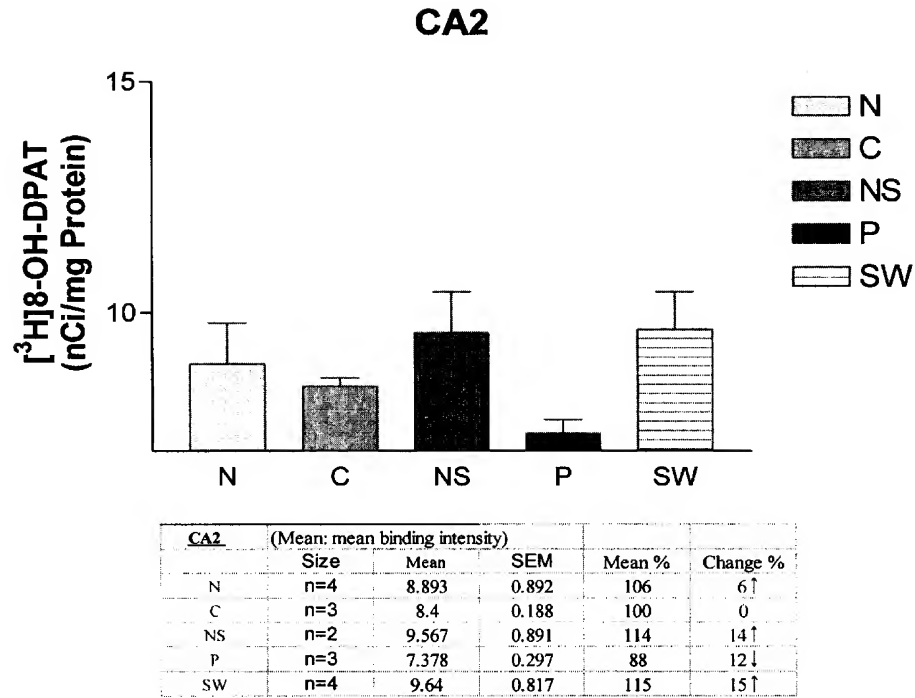
N: 정상군, C: CMS를 처리한 대조군, NS: 연자처리군, P: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리쿰 퍼포라툼 처리군

\* 정상군과 비교 했을때  $P < 0.05$ , # 대조군과 비교 했을때  $P < 0.05$

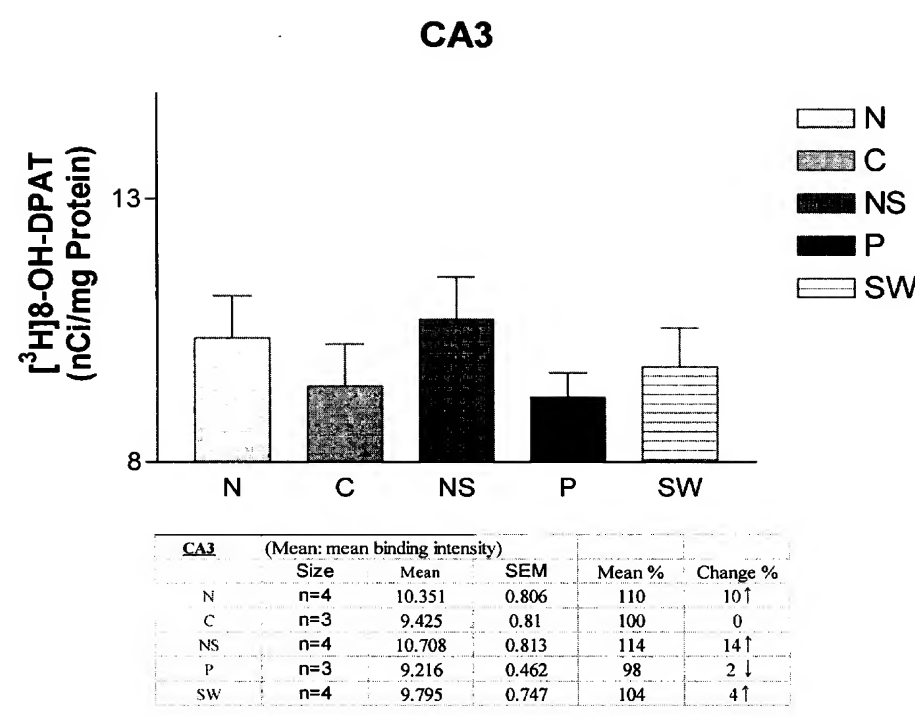
【도 13】

Receptor Binding : [ $^3$ H]8-OH-DPAT Autoradiography

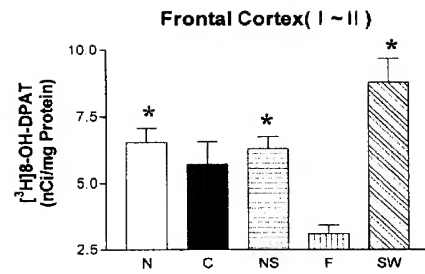








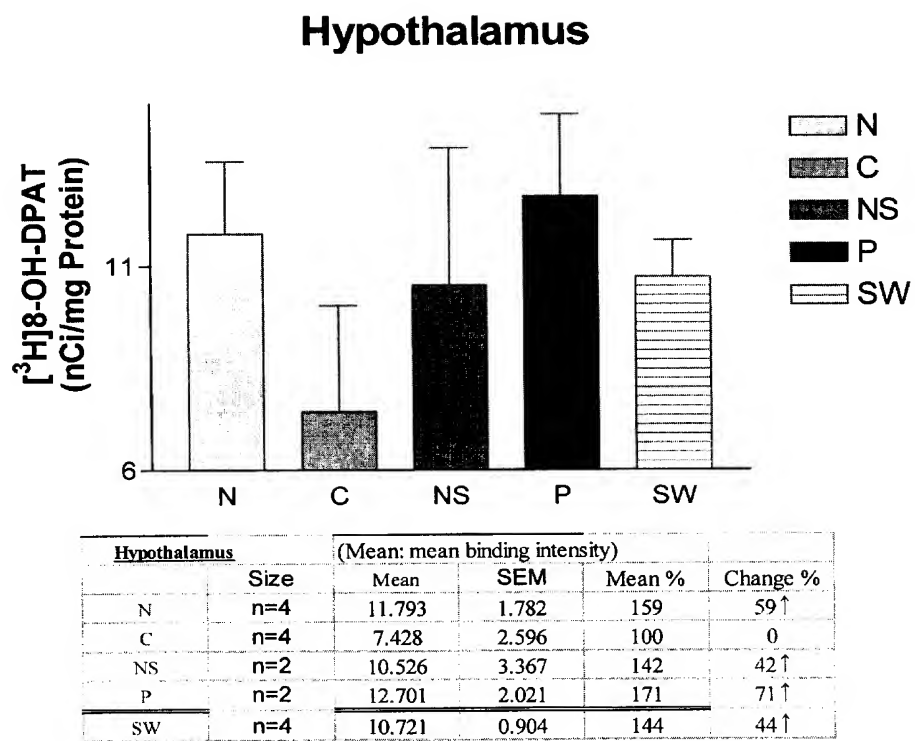
【도 16】



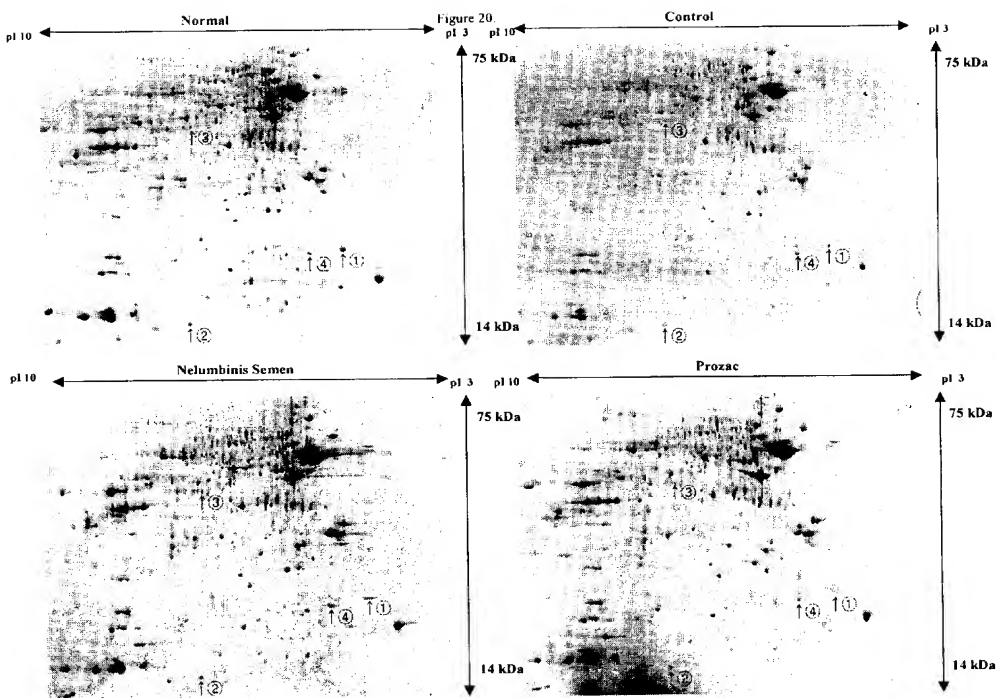
Frontal cortex (I-II)		(Mean: mean binding intensity)			
	Size	Mean	SEM	Mean %	Change %
N	n=4	6.553	0.537	115	15↑
C	n=3	5.711	0.865	100	0
NS	n=4	6.314	0.451	111	11↑
P	n=3	3.09	0.323	54	46↓
SW	n=4	8.773	0.908	154	54↑

N: 정상군, C: CMS를 처리한 대조군, NS: 연자처리군, F: 플루옥세틴 처리군, SW: 하이페리쿰 퍼포라툼 처리군

\* 플루옥세틴 처리군과 비교 했을때  $P < 0.05$



【도 18】



【도 19】

**The comparison of intensity of 4 spots in different treatment group**

<b>Spot 1-Adenylosuccinate synthetase</b> (Mean: nor volume), n=3				
	Mean	SEM	Mean %	Change %
N	0.293	0.102	227	127 ↑
C	0.129	0.043	100	0
NS	0.207	0.063	160	160 ↑
P	0.032	0.012	25	75 ↓
<b>Spot 2-Cytochrome C oxidase</b> (Mean: nor volume), n=3				
	Mean	SEM	Mean %	Change %
N	0.156	0.034	208	108 ↑
C	0.075	0.016	100	0
NS	0.166	0.025	221	121 ↑
P	0.123	0.025	164	64 ↑
<b>Spot 3-MAP kinase 2</b> (Mean: nor volume), n=3				
	Mean	SEM	Mean %	Change %
N	0.068	0.012	139	39 ↑
C	0.049	0.019	100	0
NS	0.088	0.026	178	78 ↑
P	0.117	0.047	237	137 ↑
<b>Spot 4-Aldehyde dehydrogenase I</b> (Mean: nor volume), n=3				
	Mean	SEM	Mean %	Change %
N	0.144	0.017	100	0
C	0.144	0.015	100	0
NS	0.172	0.037	119	19 ↑
P	0.091	0.025	63	37 ↓

N: normal, C: control, NS: Nelumbinis Semen, P: prozac (fluoxetine)